



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

REC'D 09 JUL 2004

WIPO

PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

03 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE



11 AVRIL 2003

75 INPI PARIS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 07 0304584

Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

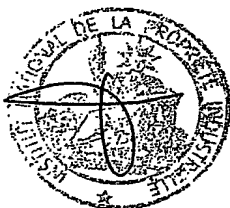
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 11 AVR. 2003 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0304584 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 11 AVR. 2003	Alain CATHERINE CABINET HARLE ET PHELIP 7 rue de Madrid 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: P954FR	

1 NATURE DE LA DEMANDE			
Demande de brevet			
2 TITRE DE L'INVENTION			
		COMPOSITION NUTRITIONNELLE OU THERAPEUTIQUE CONTENANT LE COMPOSE OLEUROPEINE OU L'UN DE SES DERIVES.	
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE		Pays ou organisation	Date N°
4-1 DEMANDEUR			
Nom	INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)		
Rue	147 rue de l'Université		
Code postal et ville	75341 PARIS cedex 07		
Pays	France		
Nationalité	France		
Forme juridique	Etablissement public		
5A MANDATAIRE			
Nom	CATHERINE		
Prénom	Alain		
Qualité	CPI: bm [92-1045, Pas de pouvoir		
Cabinet ou Société	CABINET HARLE ET PHELIP		
Rue	7 rue de Madrid		
Code postal et ville	75008 PARIS		
N° de téléphone	33 1 53 04 64 64		
N° de télécopie	33 1 53 04 64 00		
Courrier électronique	cabinet@harle.fr		
6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages
Texte du brevet		textebrevet.pdf	31
Dessins		dessins.pdf	3
			Détails
			D 26, R 4, AB 1
			page 3, figures 5
7 MODE DE PAIEMENT			
Mode de paiement		Virement bancaire	

8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	0.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	14.00	210.00
Total à acquitter	EURO			530.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



M. ROCHET

CATHERINE Alain
C.P.I. bm (92-1045 i)
Cabinet HARLE ET PHELIP

DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention se rapporte au domaine du maintien ou du rétablissement de l'équilibre du métabolisme osseux chez l'homme ou l'animal, notamment pour la prévention ou le traitement de troubles liés à un déséquilibre du métabolisme osseux grâce à l'apport nutritionnel ou à l'administration thérapeutique d'une composition stimulant la formation de l'os et/ou inhibant la résorption osseuse.

ETAT DE LA TECHNIQUE.

L'os n'est pas un tissu statique. L'os subit un remodelage constant par destruction et synthèse *de novo* du tissu osseux dans un processus complexe impliquant deux types principaux de cellules, respectivement les ostéoblastes qui produisent du tissu osseux nouveau et les ostéoclastes qui détruisent l'os.

Les activités de ces cellules sont régulées par un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance, dont la plupart ont été identifiés et clonés, comme cela est décrit dans la revue générale de Mundy (Mundy, G.R., 1996, Clin. Orthop., vol.324 :24-28 ; Mundy, G.R., 1993, J.Bone Miner Res, vol.8 : S 505 – S 510).

Les ostéoblastes, cellules responsables de la formation de l'os, se différencient à partir de cellules précurseurs et expriment et sécrètent des protéines structurales telles que le collagène de type I, ainsi que des enzymes (phosphatase alcaline) et de nombreux peptides régulateurs et les BMP (Bone Morphogenetic proteins) (Stein G. et al., 1990, Curr. Opin Cell Biol. vol.2: 1018-1027; Harris S et al., 1994, J. Bone Miner Res Vol.9:855-863).

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées qui sont responsables de la perte osseuse, dans un processus communément désigné la résorption osseuse.

En période de croissance de l'homme ou l'animal, l'activité de formation de l'os prédomine : c'est l'acquisition du capital osseux.

A l'âge adulte, chez l'homme ou l'animal, l'action équilibrée des ostéoblastes et des ostéoclastes permet un maintien dans le temps de la

masse osseuse et assure simultanément un remodelage du tissu osseux par résorption et synthèse *de novo* de l'os.

Cependant, avec l'âge, il se produit un déséquilibre dans le processus de remodelage osseux, qui aboutit à une perte d'os, qui est désignée
5 ostéopénie.

L'ostéopénie liée à l'âge est un phénomène universel, non pathologique en soi, mais qui constitue le terrain de l'ostéoporose puisque la réduction de la masse osseuse est le facteur étiologique essentiel dans la
10 genèse de cette affection, ce qui n'exclut cependant pas l'influence d'autres paramètres tels que, par exemple, l'architecture du squelette ou la propension à chuter.

En effet, exacerbée, cette ostéopénie aboutit au risque fracturaire (densité minérale au-dessous de laquelle le moindre choc est susceptible de
15 provoquer une fracture) qui détermine l'apparition de l'ostéoporose. On peut donc concevoir l'ostéoporose (post-ménopausique ou sénile) comme une pathologie infantile dont la prophylaxie pourrait être basée aussi bien (i) sur une optimisation du capital osseux (acquis au cours de la croissance de l'individu), que (ii) sur un ralentissement de la perte osseuse liée au vieillissement.

On observe une grande hétérogénéité dans la valeur du pic de masse
20 osseuse selon les individus, par suite de variations dans le processus de croissance osseuse dès le plus jeune âge. Ainsi, la masse osseuse maximale atteinte avant 30 ans, aussi désignée pic de masse osseuse, est-elle très variable d'un individu à l'autre. Avec l'âge, les individus possédant
25 une valeur faible de pic de masse osseuse sont désavantagés.

Par conséquent une prise en charge précoce de l'individu doit être privilégiée, puisque les deux phases critiques pour le capital osseux sont :

- la période de croissance, permettant l'acquisition de la masse osseuse maximale (pic de masse osseuse) ;
- 30 - le vieillissement, conditionnant la vitesse de perte de la masse osseuse.

La prévention de l'ostéoporose ne doit donc plus être restreinte à l'individu âgé.

Parmi les désordres pathologiques liés à un déséquilibre du métabolisme osseux, on peut citer notamment l'ostéoporose, la maladie de
35 Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse,

les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie due à un cancer, les myélomes multiples, et les maladies périodontales.

Certains des troubles ou pathologies du métabolisme osseux peuvent être provoqués après une immobilisation de longue durée, par exemple une hospitalisation, ou encore après un séjour en apesanteur.

Il existe d'autres facteurs susceptibles d'accroître la perte osseuse conduisant à l'ostéoporose, telle que la consommation de cigarettes, l'abus d'alcool, un mode de vie sédentaire, un faible apport en calcium, une alimentation déséquilibrée ou encore une carence en vitamine D.

Parmi les troubles liés à une résorption osseuse anormale, le plus commun est l'ostéoporose, dont la manifestation la plus fréquente est observée chez les femmes, après le début de la ménopause. L'ostéoporose est une maladie squelettique systémique caractérisée par une réduction de la masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture du tissu osseux, associées à une augmentation de la fragilité de l'os et de sa susceptibilité à la fracture.

Selon la classification clinique retenue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'état de santé de l'os d'un individu est déterminé par la valeur de la densité minérale osseuse (DMO), telle que mesurée par ostéodensitométrie, comparée à une valeur normale prédéterminée.

Un individu possédant une valeur de DMO inférieure de moins de 1 DS (DS = déviation standard) par rapport à la valeur de DMO normale prédéterminée pour l'adulte jeune est considéré comme un individu « normal » (T-score > -1 DS, dans lequel « T-score » est la différence exprimée en nombre de déviations standards DS entre la DMO de l'individu et la valeur moyenne de la DMO d'une population adulte jeune de référence).

Un individu possédant une valeur de DMO comprise entre -1 et $-2,5$ DS par rapport à celle de l'adulte jeune est classé comme un individu affecté d'une « ostéopénie » (-1 DS $>$ T-score $>$ $-2,5$ DS).

Un individu possédant une valeur de DMO inférieure à celle de l'adulte jeune de plus de 2,5 DS est classé comme individu affecté d'une ostéoporose (T-score $<$ $-2,5$ DS).

Un individu possédant une valeur de DMO inférieure à celle de l'adulte jeune de plus de 2,5 DS et chez lequel la présence d'une ou plusieurs

fractures a été décelée est classé comme un individu affecté d'une ostéoporose confirmée. (T-score < -2,5 DS + fractures).

On distingue deux types d'ostéoporose, respectivement de type I et de type II.

- 5 L'ostéoporose de type I est six fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. L'ostéoporose de type I survient surtout dans un sous-groupe de femmes ménopausées, âgées de 51 à 75 ans, et est caractérisée par une perte osseuse exagérée prédominant dans l'os trabéculaire. Les fractures des corps vertébraux et de l'extrémité inférieure de l'avant-bras en sont les complications habituelles. L'ostéoporose de type I est principalement liée à la carence hormonale oestrogénique de la ménopause, et dans une certaine mesure également de l'andropause.

- 10 L'ostéoporose de type II atteint une large population d'hommes et de femmes de plus de 70 ans et est associée à des fractures du col du fémur, de l'extrémité supérieure de l'humérus et du tibia, c'est à dire des sites osseux contenant à la fois de l'os cortical et de l'os trabéculaire. Les taux circulants de parathormone (PTH) sont souvent élevés. L'ostéoporose de type II est deux fois plus fréquente chez la femme.

- 15 Chez l'homme ou l'animal, il existe de nombreux états caractérisés par la nécessité d'accroître la formation osseuse. Par exemple, dans le cas de fractures osseuses, il est nécessaire de stimuler la croissance osseuse afin d'accélérer une réparation complète de l'os. Ce besoin est également présent dans les maladies périodontales, les maladies métastatiques de l'os, les maladies ostéolytiques et les états dans lesquels on recherche une réparation du tissu conjonctif, par exemple pour la cicatrisation ou la régénération des défauts ou des traumatismes du cartilage. On recherche également la stimulation d'une croissance osseuse dans le cas d'hyperparathyroïdisme primaire et secondaire, ainsi que dans l'ostéoporose associée au diabète et dans l'ostéoporose associée aux glucocorticoïdes, ainsi que dans l'ostéoporose androgénique chez l'homme.

- 20 25 30 35 Jusqu'à présent, les stratégies visant à rétablir une imprégnation oestrogénique (et androgénique chez l'homme) par hormonothérapie substitutive étaient fortement encouragées, notamment pour atténuer la cohorte des signes fonctionnels de la ménopause, et surtout réduire les risques vasculaires et osseux engendrés par la carence hormonale.

Néanmoins, pour diverses raisons (contre-indications, réticence à prescrire des hormones, etc.), ce type de traitement prophylactique est appliqué à moins de 30% des femmes ménopausées. Cette abstention thérapeutique risque encore d'être aggravée par le climat de suspicion actuel autour du traitement hormonal, par suite de la publication récente de deux études américaines mettant en évidence un risque cardiovasculaire et cancéreux (HERS, 1998, 2002 ; WHI, 2002).

- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E, 1998 Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group, JAMA 280(7):605-13.

- Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D, 2002 Non-cardiovascular disease outcomes during 6-8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). JAMA 288(1):58-66.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, 2002 Women's health initiative. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post menopausal women. JAMA 288:321-333.

Les modulateurs sélectifs du récepteur oestrogénique (ou SERMs, pour « Selective Estrogenic Receptor Modulators »), tels que le raloxifène, sont également préconisés. Toutefois, ils restent inefficaces sur l'incidence des bouffées de chaleur.

On connaît également des stéroïdes synthétiques, comme la tibolone, qui possède une activité oestrogénique et progestative, avec une faible propriété androgénique, mais qui peut provoquer des leucorrhées, des vaginites, de la mastodynne et qui peut entraîner une prise de poids.

De fait, il existe aujourd'hui de nombreux composés actifs sur la stimulation de la formation de l'os ou l'inhibition de la résorption osseuse, parmi lesquels on peut citer la famille des polyphosphonates, comme l'etidronate ou l'alendronate (brevet européen n°EP 210 728, demande de brevet US publiée sous le n°2001/0046977), les oxazolidinones thioamide

(demande de brevet US publiée sous le n°2002/0010341), ou encore les composés isoflavones (demande de brevet US publiée sous le n°2002/0035074). On a également proposé l'utilisation d'extrait d'une plante du genre *Lycopersicon* (demande de brevet US publiée sous le n°2002/0009510).

Bien qu'il existe aujourd'hui une grande diversité de composés actifs pour stimuler la formation osseuse et/ou inhiber la résorption osseuse, il existe un besoin constant pour de nouveaux composés actifs, notamment du fait du succès limité des traitements actuels.

De plus, compte-tenu du caractère chronique de certains états provoqués par un déséquilibre du métabolisme osseux, il existe un besoin pour de nouveaux composés actifs susceptibles de pouvoir être utilisés pendant une longue période du temps chez l'homme ou l'animal.

C'est pourquoi les professionnels de la santé, ainsi que les instances officielles de réglementation (rapport sur l'ostéoporose dans la Communauté Européenne, 1998), recommandent d'intégrer des thérapies validées complémentaires, voire alternatives. Une approche nutritionnelle (par exemple sous la forme d'une composition) répond tout à fait à ces critères.

20 **SOMMAIRE DE L'INVENTION.**

De manière surprenante, le demandeur a montré que l'oleuropéine, qui est un composé contenu notamment dans les plantes de la famille des *oleaceae*, est capable d'agir sur le métabolisme osseux en freinant la déminéralisation de l'os.

Il est donc fourni selon l'invention, une composition nutritionnelle et une composition pharmaceutique à usage humain ou vétérinaire comprenant, à titre de composé actif, l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

L'invention est également relative à l'utilisation du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés pour la fabrication d'une composition destinée à stimuler la minéralisation de l'os, en particulier la formation de l'os et/ou l'inhibition de la résorption osseuse chez l'homme ou l'animal.

Selon un premier aspect, l'utilisation ci-dessus est caractérisée en ce que ladite composition est une composition nutritionnelle adaptée pour une administration orale.

Selon un second aspect, l'utilisation ci-dessus est caractérisée en ce que ladite composition est une composition pharmaceutique pour une administration orale, parentérale, intramusculaire ou intra-veineuse.

5 **DESCRIPTION DES FIGURES.**

La **Figure 1** illustre l'évolution pondérale (i) des rates témoins (SH), (ii) des rates ovariectomisées et ayant subi une inflammation (OVX inf) ayant reçu un régime alimentaire témoin, (iii) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant un extrait d'oleuropéine (OL) et (iv) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (HO). En ordonnées : le poids corporel moyen des rates ; en abscisses : la durée du traitement suivant le moment de l'ovariectomie.

La **Figure 2** illustre le poids utérin (i) des rates témoins (SH), (ii) des rates ovariectomisées et ayant subi une inflammation (OVX inf) ayant reçu un régime alimentaire témoin, (iii) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (HO), et (iv) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant un extrait d'oleuropéine (OL). En ordonnées : le poids utérin moyen des rates +/- l'erreur standard par rapport à la moyenne (SEM) ; en abscisses : chaque groupe de rates. Pour les lots OVX inf, HO et OL, * $p < 0,0001$ par rapport au groupe témoin SH.

La **Figure 3** illustre la densité minérale osseuse totale (figure 3A), la densité minérale osseuse corticale (figure 3B) et la densité minérale osseuse trabéculaire (figure 3C), respectivement (i) des rates témoins (SH), (ii) des rates ovariectomisées et ayant subi une inflammation (OVX inf) ayant reçu un régime alimentaire témoin, (iii) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (HO), et (iv) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant un extrait d'oleuropéine (OL). En ordonnées : la densité minérale osseuse (DMO), exprimée en g/cm^2 +/- l'erreur standard par rapport à la moyenne (SEM) ; en abscisses : chaque groupe de rates. « a » : $p < 0,001$ par rapport au groupe témoin SH. « a' » : $p < 0,01$ par rapport au groupe témoin SH. « b » : $p < 0,005$ par rapport au groupe OVX inf. « b' » : $p < 0,05$ par rapport au groupe OVX inf.

La **Figure 4** illustre la concentration plasmatique en orosomucoïde (i) des rates témoins (SH), (ii) des rates ovariectomisées et ayant subi une inflammation (OVX inf) ayant reçu un régime alimentaire témoin, (iii) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (HO), et (iv) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant un extrait d'oleuropéine (OL). En ordonnées : concentration d'orosomucoïde, exprimée en $\mu\text{g/ml}$, +/- l'erreur standard par rapport à la moyenne (SEM). En abscisses : chaque groupe de rates. « a » : $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin SH ; « b » : $p < 0,01$ par rapport au groupe OVX inf.

La **Figure 5** illustre le poids de la rate (i) des rates témoins (SH), (ii) des rates ovariectomisées et ayant subi une inflammation (OVX inf) ayant reçu un régime alimentaire témoin, (iii) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant de l'huile d'olive (HO), et (iv) des rates « OVX inf » ayant reçu un régime alimentaire contenant un extrait d'oleuropéine (OL). En ordonnées : poids moyen de la rate +/- l'erreur standard par rapport à la moyenne (SEM) +/- l'erreur standard par rapport à la moyenne (SEM). « a » : $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin SH ; « b » : $p < 0,01$ par rapport au groupe OVX inf.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION.

Il est fourni selon l'invention, une composition nutritionnelle et une composition pharmaceutique à usage humain ou vétérinaire destinées à stimuler la minéralisation osseuse, en particulier à stimuler la formation de l'os et/ou à inhiber la résorption osseuse, chez l'homme ou l'animal et comprenant, à titre de composé actif, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

L'oleuropéine est un glycoside amer qui est retrouvé notamment dans le fruit, les racines, le tronc et tout particulièrement dans les feuilles des plantes appartenant à la famille des *oleaceae*, et plus spécialement des *Olea europaea*.

L'oleuropéine est connue notamment pour son activité anti-oxydante et anti-inflammatoire, ainsi que pour ses propriétés anti-fongiques, anti-bactériennes et anti-virales.

L'activité anti-inflammatoire de l'oleuropéine a été mise en évidence du fait de sa propriété de bloquer la flambée respiratoire (« oxidative burst ») des cellules polynucléaires neutrophiles, phénomène à l'origine de la surproduction de radicaux libres lors des réactions inflammatoires de l'organisme.

L'activité anti-virale de l'oleuropéine, ainsi que de certains dérivés de l'oleuropéine, est décrite notamment dans la demande PCT n° WO 96/14064 et dans les brevets américains n° US 6,455,580 et US 6,117,844. L'utilisation de l'oleuropéine pour le traitement d'affections liées au virus de l'*influenza* est décrite dans le brevet américain n° US 6,455,070.

L'utilisation de l'oleuropéine pour la fabrication de compositions pharmaceutiques pour traiter le psoriasis a aussi été décrite, notamment dans le brevet américain n° US 6,440,465.

De manière surprenante, il a été montré selon l'invention que l'oleuropéine stimule la formation de l'os et inhibe la résorption osseuse.

Comme cela est illustré par les exemples, l'oleuropéine induit une augmentation de la densité du tissu osseux métaphysaire (os trabéculaire) et de la densité du tissu osseux diaphysaire (os cortical), permettant ainsi une amélioration de la minéralisation osseuse, en particulier dans des modèles expérimentaux d'ostéoporose post-ménopausique et sénile.

Plus spécifiquement, l'oleuropéine inhibe la résorption osseuse chez des rates ovariectomisées, qui est le modèle expérimental animal de référence mimant l'ostéoporose humaine.

On a aussi montré selon l'invention que l'effet d'induction de la minéralisation du tissu osseux provoqué par l'oleuropéine était accompagné d'une activité anti-inflammatoire, comme en témoigne une concentration réduite en orosomucoïde plasmatique, et une absence d'augmentation du poids de la rate, chez les individus ovariectomisés, comme cela est montré dans les exemples.

Cette combinaison de propriétés biologiques surprenante de l'oleuropéine la rend apte notamment à la prévention ou au traitement de l'ostéoporose de type I, mais aussi de l'ostéoporose de type II, qui est souvent accompagnée de réactions inflammatoires.

De plus, comme cela est montré dans les exemples, l'oleuropéine ne présente pas de manière détectable d'effet mimant l'activité d'un composé

d'oestrogène, dit aussi effet « estrogen-like », comme en témoignent l'absence de prise de poids des rates traitées, ainsi que l'absence d'effet de l'oleuropéine sur le poids utérin. Ces résultats confirment l'intérêt de l'oleuropéine pour la prévention ou le traitement de tous les troubles du tissu osseux ou pour le maintien de la santé de l'os, chez l'homme ou l'animal, puisque l'activité biologique d'induction de la minéralisation osseuse de l'oleuropéine n'apparaît pas restreinte aux situations dans lesquelles un déficit hormonal est constaté, ou prévu.

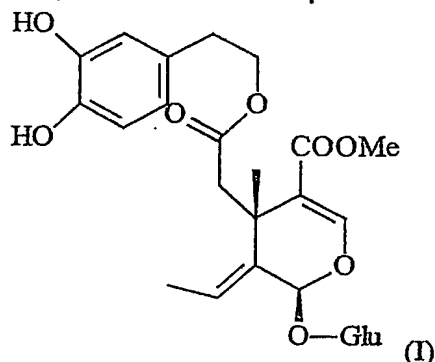
Cette activité de minéralisation de l'os induite par l'oleuropéine lui confère une grande utilité en tant que composé actif chez l'homme ou l'animal pour maintenir ou rétablir l'équilibre du métabolisme osseux, c'est-à-dire :

- soit maintenir constante au cours du temps, avec l'âge, les activités des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques et ainsi prévenir des troubles du métabolisme osseux ;
- soit remédier à un déséquilibre du métabolisme osseux, par exemple dans des troubles comme l'ostéoporose, ou encore stimuler la régénération osseuse, par exemple en cas de fêlure ou fracture de l'os.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés pour la fabrication d'une composition apte à maintenir ou à rétablir l'équilibre du métabolisme osseux chez l'homme ou l'animal, en stimulant la formation de l'os et/ou en inhibant la résorption osseuse.

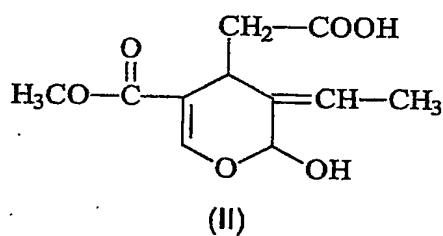
L'invention est également relative à l'utilisation du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés pour la fabrication d'une composition apte à bloquer la déminéralisation du tissu osseux, chez l'homme ou l'animal.

Par « oleuropéine », on entend le composé de formule (I) suivante :

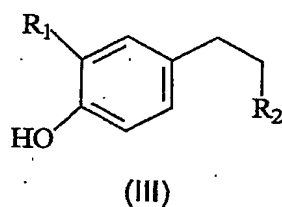


Par « dérivé de l'oleuropéine », on entend respectivement les composés suivants :

(a) l'acide élénolique de formule (II) suivante :

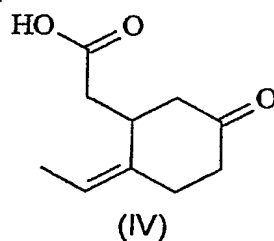


(b) la lactone de formule (III) suivante :

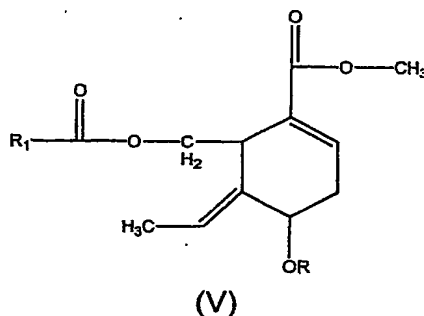


dans laquelle R_2 représente un groupe hydroxyle et R_1 représente l'hydrogène (tyrosol) ou un groupe hydroxyle (hydroxytyrosol);

(c) le composé lactone de formule (IV) suivante :



(d) les composés de formule (V) suivante :



5

10 dans laquelle R représente un groupe glycosyl ou un atome d'hydrogène ;
 R₁ représente le groupe 2-(3,4-dihydroxyphenyl) éthyl, le groupe 2-(4-hydroxyphenyl éthyl), un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle ;

(e) l'acide oléanique ;

(f) les produits formés par l'hydrolyse de chacun des composés de formule (I) à (V) ci-dessus dans le tube digestif.

15 L'acide elenolique et l'hydroxytyrosol sont des dérivés de l'oleuropéine qui résultent de la métabolisation de l'oleuropéine dans l'organisme.

Les composés de formule (V) dans lesquels R₁ représente le groupe 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl ou le groupe 2-(4-hydroxyphenyl ethyl) sont retrouvés naturellement dans les plantes de la famille *Olea europea*, par exemple dans les variétés de *Olea europea* dénommées Manzanillo et Mission.

25 Le dérivé d'oleuropéine de formule (V) dans lequel R₁ représente le groupe 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl peut être isolé aisément à partir des feuilles d'olivier (*Olea europaea*) par extraction dans une solution aqueuse ou dans une solution eau/alcool à température de 20°C-25°C, et mieux à une température comprise entre 40°C et 100°C.

L'oleuropéine peut être purifiée, par exemple par des procédés de séparation par chromatographie.

A titre illustratif, l'oleuropéine peut être préparée à partir de feuilles de *Olea europaea* selon l'enseignement du brevet américain n° US 5,714,150, par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) immerger les feuilles de *Olea europaea* avec une solution d'extraction consistant essentiellement en une solution alcoolique contenant au moins 25 % en poids d'alcool, par exemple d'éthanol, pendant une durée d'au moins 4 heures ;
- b) récupérer la solution d'extraction obtenue à la fin de l'étape a) ;
- 10 c) immerger une seconde fois les feuilles de *Olea europaea* de l'étape a) avec une nouvelle solution d'extraction, de composition identique à celle définie ci-dessus, pendant une durée d'au moins 4 heures ;
- d) récupérer la solution d'extraction obtenue à la fin de l'étape c) ;
- e) réunir les solutions d'extraction obtenues respectivement à l'étape b) et à l'étape c) ;
- 15 f) distiller sous vide la solution obtenue à l'étape e), par exemple à 70°C, afin d'obtenir un concentré contenant de 30% à 40% en poids de solides; et
- g) sécher le concentré obtenu à la fin de l'étape f), par exemple par atomisation à 70°C, pour obtenir un extrait sous forme de particules
- 20 contenant de 30% à 40% en poids du composé oleuropéine.

L'oleuropéine peut aussi être préparée par extraction à partir de feuilles de *Olea europaea* selon l'enseignement de la demande de brevet américain publiée sous le n° US 2003-0017217 le 23 janvier 2003.

25 L'oleuropéine ou l'un quelconque de ses dérivés peut également être préparé conformément à l'enseignement de la demande PCT n° WO 96/14064 publiée le 17 mai 1996.

30 Par « stimulation de la formation de l'os », on entend, selon l'invention, la capacité de l'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés à stimuler l'activité des ostéoblastes et favoriser ainsi la synthèse de la trame protéique de l'os et le dépôt des minéraux, surtout du calcium, sur cette trame protéique, c'est-à-dire à stimuler la minéralisation de l'os, encore appelée accrétion osseuse.

Pour vérifier que l'apport en oleuropéine à un homme ou un animal, en particulier un mammifère, stimule la formation de l'os, l'homme du métier pourra notamment avoir recours à des mesures conventionnelles de

densitométrie et vérifier que l'apport d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés, à une dose donnée, induit un accroissement de la densité osseuse.

Par « inhibition de la résorption osseuse », on entend selon l'invention, une inhibition de l'activité de destruction du tissu osseux par les cellules
 5 ostéoclastes. Pour vérifier que l'apport d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés, chez l'homme ou l'animal, inhibe la résorption osseuse, l'homme du métier peut mesurer l'excrétion urinaire de désoxypyridinoline, une diminution de l'excrétion de la désoxypyridinoline étant le reflet d'une inhibition de la résorption osseuse (*in* Les marqueurs biologiques de
 10 remodelage osseux : variations pré-analytique et recommandations pour leur utilisation., P. GARNERO, F. BIANCHI, P.C. CARLIER, V. GENTY, N. JACOB, S.KAMEL, C. KINDERMANS, E. PLOUVIER, M.PRESSAC & J.C. SOUBERBIELLE. Annales de Biologie Clinique, 58 (6), 683-704 (2000)).

L'apport d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés à un organisme
 15 animal induit simultanément une stimulation de la formation de l'os et une inhibition de la résorption osseuse, l'accroissement global de la minéralisation osseuse, et donc de la densité de l'os, étant le résultat de l'induction de ces deux mécanismes.

Pour déterminer si un sujet présente un état d'ostéopénie (masse
 20 osseuse réduite), et nécessite en conséquence un apport d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés, l'homme du métier pourra se référer notamment au rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 1994 intitulé « Assessment of fracture risk and its application to screening for post-menopausal osteoporosis » WHO Technical Series-843 ».

Une composition nutritionnelle ou une composition thérapeutique
 25 contenant de l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés comme composé actif est destinée tout d'abord à la prévention de la perte osseuse due à un déséquilibre dans le remodelage du tissu osseux, chez l'homme ou l'animal, en particulier chez un mammifère non humain, notamment un mammifère
 30 domestique comme le chien ou le chat, ou encore un cheval.

Une composition telle que définie ci-dessus est également destinée à favoriser la croissance osseuse chez les individus jeunes afin d'optimiser l'acquisition du capital osseux. En particulier, une composition selon l'invention est utile pendant la phase de croissance de l'homme ainsi que des
 35 autres mammifères.

La composition contenant de l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés est aussi destinée aux individus présentant des symptômes de déficit osseux (ostéopénie), ou susceptibles de souffrir de déficit osseux, c'est-à-dire d'un déséquilibre du rapport entre la formation de l'os et la résorption osseuse lequel, s'il se poursuit, induit une diminution de la masse osseuse. Une composition selon l'invention est également destinée aux individus présentant une expression clinique de la pathologie, à savoir une fracture, ou une maladie dentaire.

En particulier, une composition nutritionnelle ou pharmaceutique à destination humaine ou vétérinaire selon l'invention est utile dans le traitement de pathologies telles que l'ostéoporose de type I ou de type II, les ostéoporoses secondaires, la maladie de Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse, les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie due à un cancer, les myélomes multiples, les maladies periodontales ou encore l'ostéoarthrite.

Le fait que l'oleuropéine induise une augmentation non seulement de la densité de l'os trabéculaire, mais également de la densité de l'os cortical démontre le haut niveau d'activité biologique de cette molécule.

En effet, l'os trabéculaire, qui forme la tête de l'os et qui est fortement vascularisé, est le lieu privilégié des échanges de calcium entre l'os et la circulation sanguine, alors que l'os cortical, qui forme le corps droit de l'os, est très peu vascularisé et constitue donc une cible biologique peu accessible aux composés stimulant la formation de l'os et/ou inhibant la résorption osseuse. Pourtant, l'accessibilité de l'os cortical aux composés actifs est importante, du fait que ce tissu osseux, participe pleinement au maintien de la rigidité du squelette (propriétés biomécaniques).

La composition selon l'invention peut se présenter sous la forme d'une composition nutritionnelle ou encore sous la forme d'une composition pharmaceutique, comme cela est décrit ci-après.

Compositions nutritionnelles contenant de l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

Comme cela a déjà été mentionné ci-dessus, de nombreux troubles liés à un déséquilibre du métabolisme osseux, telle que l'ostéoporose, évoluent progressivement sur une longue période de temps et nécessitent

des traitements chroniques. Leur prévention ou leur traitement peut donc être réalisé grâce à un apport régulier d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés, préférentiellement sous la forme d'une composition nutritionnelle.

De même, un apport nutritionnel régulier d'oleuropéine à des individus
5 jeunes en croissance, hommes ou animaux, est de nature à permettre d'optimiser le pic de masse osseuse et par conséquent la densité minérale osseuse à l'âge adulte.

Egalement, un apport nutritionnel régulier d'oleuropéine est utile pour prévenir la perte osseuse qui se produit au cours du vieillissement.

10 L'invention a pour objet une composition nutritionnelle pour stimuler la formation de l'os et/ou inhiber la résorption osseuse, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de composé nutritionnel actif, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

Par « composition nutritionnelle », on entend selon l'invention, une
15 composition contenant de l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés et constituant une composition alimentaire ou encore un supplément alimentaire ne possédant pas les caractéristiques d'un médicament.

Les différentes utilisations du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés pour la fabrication d'une composition nutritionnelle seront définies ci-
20 après en relation avec les caractéristiques techniques de ladite composition nutritionnelle.

Une composition nutritionnelle selon l'invention est préférentiellement adaptée pour une administration orale.

Selon un premier aspect, une composition nutritionnelle selon
25 l'invention est un aliment diététique utilisé pour le maintien d'une bonne santé de l'homme ou l'animal qui l'ingère. Une telle composition nutritionnelle est également communément désignée « aliment fonctionnel », lequel est destiné à être consommé, soit comme partie intégrante du régime alimentaire, soit comme supplément alimentaire, mais dont le contenu en
30 oleuropéine ou en l'un de ses dérivés implique un rôle physiologique allant au-delà de la fourniture des besoins nutritifs de base.

Selon un premier aspect, ladite composition nutritionnelle est destinée à stimuler la formation de l'os chez les individus jeunes en phase de croissance.

Selon un second aspect, ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir la perte osseuse qui se produit avec le vieillissement (ostéopénie).

Selon un troisième aspect, que ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir ou traiter des troubles liés à un déséquilibre du rapport
5 entre la formation de l'os et la résorption osseuse.

Selon un quatrième aspect, ladite composition nutritionnelle est destinée à traiter un déficit osseux résultant d'une fracture.

Selon encore un autre aspect, ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir des pathologies choisies parmi l'ostéoporose de type I ou
10 de type II, les ostéopénies secondaires, la maladie de Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse, les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie due à un cancer, les myélomes multiples, les maladies periodontales ou l'ostéoarthrite.

Une composition nutritionnelle selon l'invention, caractérisée en ce
15 qu'elle comprend le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés, en tant que composé actif, et se présente sous une grande diversité de formes de compositions alimentaires et de boissons, y compris des jus (de fruits ou de légumes), huiles, beurres, margarines, matières grasses végétales, conserves (par exemple thon à l'huile), soupes, préparations à base de lait
20 (yaourts, fromage blanc), glaces, fromages (par exemple des fromages conservés dans de l'huile), produits cuits (tels que le pain, les biscuits et les gâteaux), desserts, produits de confiserie, barres de céréales, céréales pour le petit déjeuner, condiments, produits d'assaisonnement des aliments (notamment épices et sauces).

25 Lorsque l'oleuropéine, ou un dérivé de l'oleuropéine, est extrait à partir de la feuille, une composition nutritionnelle selon l'invention est avantageusement utilisée sous la forme d'une solution aqueuse.

Lorsque l'oleuropéine, ou un dérivé de l'oleuropéine, est extrait à partir de l'olive, une composition nutritionnelle selon l'invention est
30 avantageusement utilisée sous la forme d'une solution huileuse.

Une composition nutritionnelle selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés, en tant que composé actif, peut aussi se présenter sous la forme d'une grande diversité de produits destinés à l'alimentation animale, qu'ils soient sous forme

humide, sous forme semi-humide ou sous forme sèche , notamment sous la forme de croquettes.

Comme cela a déjà été mentionné ci-dessus, l'oleuropéine est un composé majoritaire retrouvé dans les différentes parties, y inclus les
5 feuilles, des plantes de la famille des *Oleaceae*, et plus spécialement dans les feuilles des plantes du genre *Olea europaea* (olivier).

Ainsi, selon un premier aspect préféré, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés se présente sous la forme d'un produit d'extraction obtenu à partir d'une plante appartenant à la famille des *Oleaceae*. De manière
10 préférée, le produit d'extraction consiste en un produit extrait à partir des tiges, feuilles, des fruits ou des noyaux d'une plante appartenant à la famille des *Oleaceae*.

Préférentiellement, la plante appartenant à la famille des *Oleaceae* est choisie parmi *Olea europaea* (l'olivier), une plante du genre *Ligustrum*, une
15 plante du genre *Syringa*, une plante du genre *Fraxinus*, une plante du genre *Jasminum* et une plante du genre *Osmanthus*.

Selon un second aspect préféré, le produit d'extraction consiste en de l'huile d'olive ou en un extrait riche en oleuropéine obtenu à partir de l'huile d'olive.

20 Selon un troisième aspect préféré, le produit d'extraction consiste en un extrait obtenu à partir des feuilles de *Olea europaea*, qui se présente sous la forme d'un liquide ou sous la forme d'une poudre.

Selon un quatrième aspect, une composition nutritionnelle selon l'invention peut consister en une composition alimentaire enrichie en huile
25 d'olive ou en extrait d'huile d'olive ou de feuilles d'olivier.

Selon un cinquième aspect, une composition nutritionnelle selon l'invention se présente sous la forme de tout produit, en particulier toute boisson, par exemple une boisson aromatisée.

Ainsi, une composition nutritionnelle selon l'invention, qui se présente
30 sous une forme liquide ou sous une forme solide, notamment sous la forme d'une poudre, peut consister en un produit d'extraction obtenu à partir de l'huile d'olive ou des feuilles d'olivier, ou encore comprendre un produit d'extraction obtenu à partir de l'huile d'olive ou des feuilles d'olivier.

Notamment, une composition nutritionnelle selon l'invention se
35 présente sous la forme d'une boisson.

De manière générale, une composition nutritionnelle selon l'invention se présente sous l'une quelconque des formes décrites dans la présente description, et en particulier les aliments à base de matière grasses (beurre, huile, margarine), pain, gâteaux, ou encore de produits alimentaires conservés dans de l'huile, tels que des fromages, des poissons, des viandes, des légumes, des salades) ou encore sous la forme de produit pour l'assaisonnement des aliments, tels que les condiments.

Selon un autre aspect, dans une composition nutritionnelle selon l'invention, l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés produit par extraction ou par synthèse chimique.

De préférence, une composition nutritionnelle selon l'invention comprend une quantité de composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés adaptée à une administration orale quotidienne comprise entre 0,01 mg et 200 mg.

Pour une consommation chez l'homme, une composition nutritionnelle selon l'invention comprend une quantité de composé actif adaptée à un apport quotidien en oleuropéine ou en l'un de ses dérivés, fourni par ladite composition, comprise entre 0,01 mg et 200 mg, de préférence entre 0,1 mg et 200 mg et de manière tout à fait préférée entre 1 mg et 200 mg.

Pour une consommation par un animal, spécifiquement un mammifère non humain, une composition nutritionnelle selon l'invention est adaptée à une administration quotidienne de composé actif, fournie par ladite composition, comprise entre 1 mg et 200 mg, de préférence 10 mg et 200 mg d'oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

Selon encore un autre aspect, la composition nutritionnelle ci-dessus peut comprendre d'autres composés nutritionnels, en combinaison avec l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

Ainsi, la composition nutritionnelle selon l'invention peut également comprendre une source de calcium, par exemple sous la forme d'un composé organique ou inorganique physiologiquement acceptable, tels que des sels de calcium inorganique (chlorure de calcium, phosphate de calcium, sulfate de calcium, oxyde de calcium, hydroxyde de calcium ou carbonate de calcium) ou des composants organiques contenant du calcium telle que la poudre de lait écrémé, le caséinate de calcium ou encore des sels

organiques de calcium (citrate de calcium, maléate de calcium ou leurs mélanges).

La quantité de calcium contenue dans une composition nutritionnelle selon l'invention est adaptée pour une administration quotidienne, fournie par ladite composition, comprise entre 100 mg et 1000 mg, de préférence entre 200 mg et 700 mg et de manière tout à fait préférée entre 300 mg et 600 mg de calcium.

Une composition nutritionnelle selon l'invention peut également comprendre des vitamines, telle que la vitamine A, la vitamine D, la vitamine E, la vitamine K, la vitamine C, l'acide folique, la thiamine, la riboflavine, la vitamine B₆, la vitamine B₁₂, la niacine, la biotine ou encore l'acide pantothénique.

Une composition nutritionnelle selon l'invention peut également comprendre des éléments minéraux et des éléments trace tels que le sodium, le potassium, le phosphore, le magnésium, le cuivre, le zinc, le fer, le sélénium, le chrome et le molybdène.

Elle peut également comprendre des fibres solubles telles que l'agar-agar, un alginat, du caroube, du carragheen, de la gomme arabique, de la gomme de guar, de la gomme de karaya, de la pectine ou de la gomme xanthane, ces fibres solubles étant sous une forme hydrolysée ou non hydrolysée.

Elle peut aussi comprendre des composés source d'énergie, notamment une ou plusieurs sources d'hydrates de carbone choisis parmi les maltodextrines, l'amidon, le lactose, le glucose, le sucrose, le fructose, le xylitol et le sorbitol et éventuellement les acides gras tels que les oméga-3.

En outre, une composition nutritionnelle selon l'invention peut également comprendre des épices ou encore des herbes aromatiques.

Elle peut également comprendre des composés de type polyphénol, distincts de l'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés.

Comme cela a déjà été mentionné précédemment, une composition destinée à stimuler la formation de l'os ou à inhiber la résorption osseuse selon l'invention peut aussi être présentée sous la forme d'une composition pharmaceutique, comme décrit ci-dessous.

Compositions pharmaceutiques humaines ou vétérinaires selon l'invention.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire pour stimuler la formation de l'os et/ou pour inhiber la
5 résorption osseuse, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

En particulier, l'invention concerne l'utilisation de l'oleuropéine ou de l'un de ces dérivés pour la fabrication d'une composition pharmaceutique à usage humain ou vétérinaire pour la prévention ou le traitement d'une
10 pathologie liée à un déséquilibre du métabolisme osseux, c'est-à-dire une composition pharmaceutique apte à stimuler la formation de l'os et/ou à inhiber la résorption osseuse.

Les utilisations de l'oleuropéine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique seront décrites en relation avec les caractéristiques techniques de ladite composition pharmaceutique ci-après.
15

Une composition pharmaceutique selon l'invention comprend, en tant que principe actif, l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés, en une quantité adaptée pour stimuler la formation de l'os ou inhiber la résorption osseuse chez des individus nécessitant un tel traitement.

20 Selon un premier aspect, une composition pharmaceutique selon l'invention est utile pour stimuler la formation de l'os chez les individus jeunes, homme ou animaux, en phase de croissance, afin d'augmenter la densité osseuse atteinte au début de l'âge adulte.

25 Selon un second aspect, une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire selon l'invention est utile pour prévenir la perte osseuse qui se produit, au cours du vieillissement.

30 Selon un troisième aspect, une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire selon l'invention est utile pour prévenir ou traiter des troubles ou des pathologies liés à un déséquilibre du rapport entre la formation de l'os et la résorption osseuse.

Selon un quatrième aspect, une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire selon l'invention est utile pour traiter un déficit osseux résultant d'une fracture.

35 Selon un cinquième aspect, une composition pharmaceutique à destination humaine ou vétérinaire selon l'invention est utile dans le

traitement de pathologies liées à un déséquilibre du remodelage osseux, telles que, l'ostéoporose de type I ou de type II, les ostéoporoses secondaires, la maladie de Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse, les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie
5 due à un cancer, les myélomes multiples, les maladies periodontales ou encore l'ostéoarthrite.

Il peut s'agir d'une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire, en particulier pour le chien ou le chat, ou encore le cheval.

La composition pharmaceutique selon l'invention se présente sous
10 une forme pour l'administration orale, parentérale, intramusculaire ou intra-veineuse.

Dans sa forme destinée à l'administration humaine, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend avantageusement, une quantité d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés adaptée pour une administration
15 quotidienne du composé actif, fournie par ladite composition, comprise entre 0,01 mg et 200 mg.

Sous sa forme destinée à une administration chez l'animal, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une quantité d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés adaptée à une administration
20 quotidienne du composé actif, fourni par ladite composition, comprise entre 1 mg et 200 mg.

Une composition pharmaceutique selon l'invention comprend l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés en association avec au moins un excipient choisi dans le groupe constitué par les excipients
25 pharmaceutiquement acceptables.

Des techniques de préparation de compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être aisément retrouvées par l'homme du métier, par exemple dans l'ouvrage Remmingston's Pharmaceutical Sciences, Mid. Publishing Co, Easton, PA, USA.

Des adjuvants, des véhicules et des excipients physiologiquement acceptables sont aussi décrits dans l'ouvrage intitulé "Handbook of Pharmaceutical Excipients, Seconde édition, American Pharmaceutical Association, 1994.

Pour formuler une composition pharmaceutique selon l'invention,
35 l'homme du métier pourra avantageusement se référer à la dernière édition

de la Pharmacopée Européenne ou de la Pharmacopée des Etats-Unis d'Amérique (USP).

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un extrait huileux d'oleuropéine comme excipient pour la préparation d'une composition pharmaceutique (combinaison avec d'autres principes actifs, par exemple).

L'homme du métier pourra notamment avantageusement se référer à la quatrième édition « 2002 » de la Pharmacopée Européenne, ou encore à l'édition USP 25-NF 20 de la Pharmacopée Américaine (U.S. Pharmacopeia).

Une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus est adaptée pour une administration orale, parentérale, intramusculaire ou intraveineuse.

Lorsque la composition pharmaceutique selon l'invention comprend au moins un excipient pharmaceutique ou physiologiquement acceptable, il s'agit en particulier d'un excipient approprié pour une administration de la composition par voie orale ou d'un excipient approprié pour une administration de la composition par voie parentérale.

L'invention concerne aussi une méthode pour prévenir ou traiter un trouble lié à un déséquilibre du métabolisme osseux, en particulier un trouble associé à une perte de la masse osseuse, ladite méthode comprenant une étape au cours de laquelle on administre aux patients une quantité thérapeutiquement efficace d'oleuropéine ou de l'un de ses dérivés ou encore d'une composition pharmaceutique contenant l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés.

Une composition pharmaceutique comprenant de l'oleuropéine ou l'un de ses dérivés selon l'invention se présente indifféremment sous une forme solide ou sous une forme liquide.

Pour une administration orale, on préférera une composition pharmaceutique solide, sous la forme de comprimés, de capsules ou de gélules.

Sous la forme liquide, on préférera une composition pharmaceutique sous la forme d'une suspension aqueuse ou d'une suspension lipidique, ou encore sous la forme d'une émulsion eau-dans-huile ou huile-dans-eau.

Des formes pharmaceutiques solides peuvent comprendre, en tant que véhicules, adjuvants ou excipients, au moins un agent diluant, un arôme,

un agent solubilisant, un agent lubrifiant, un agent de suspension, un agent liant, un agent désintégrant et un agent d'encapsulation, l'identité et la fonction de ces différents excipients classiques étant documentées complètement dans la Pharmacopée Européenne ou dans la Pharmacopée des Etats-Unis d'Amérique (USP).

De tels composés sont par exemple le carbonate de magnésium, le stéarate de magnésium, le talc, le lactose, la pectine, la dextrine, l'amidon, la gélatine, des matériaux cellulosiques, du beurre de cacao, etc.

Les compositions sous forme liquide peuvent comprendre également de l'eau, le cas échéant en mélange avec du propylène glycol ou du polyéthylène glycol, et éventuellement aussi des agents de coloration, des arômes, des stabilisants et des agents épaississants.

Pour la fabrication d'une composition pharmaceutique selon l'invention, l'oleuropéine, ou l'un de ses dérivés, peut être préparé conformément à l'enseignement des différents documents de brevets cités précédemment dans la description.

L'invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

20 **EXEMPLES**

Les résultats des exemples montrent les effets ostéoprotecteurs de l'oleuropéine ou de l'huile d'olive, sur un modèle animal de perte osseuse représentatif de l'ostéoporose sénile par induction d'une inflammation chronique (vieillissement) couplée à une ablation des ovaires (cas de la ménopause).

A. MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été conduite sur 40 rates Wistar âgées de 6 mois : trente ovariectomisées (OVX) et 10 pseudo-opérées (SH). Les animaux ont été logés dans des cages métaboliques permettant le recueil séparé des urines à une température contrôlée de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, selon un cycle nyctéméral de 12h – 12h. Après l'intervention chirurgicale à JO, les animaux ont été accoutumés pendant sept jours à un régime semi-synthétique de base (INRA Jouy en Josas), additionné de 2,5% d'huile d'arachide et de 2,5% d'huile de colza et humidifié à raison de 1 ml d'eau par gramme de poudre. A l'issue de cette

période d'adaptation, les rongeurs ont été répartis sur la base des paramètres pondéraux en 4 lots homogènes et ont reçu quotidiennement pendant 72 jours 22g des régimes suivants :

- 5 • Lot SH / 10 rates pseudo-opérées alimentées avec le régime contrôle (régime de base additionné de 2,5% d'huile d'arachide et de 2,5% d'huile de colza),
- Lot OVXinf : 10 rates ovariectomisées ayant reçu le régime contrôle,
- 10 • Lot OL : 10 rates ovariectomisées ayant consommé le régime contrôle additionné de 0,015% d'oleuropéine.
- Lot HO : 10 rates ovariectomisées auxquelles était distribué le régime de base additionné de 5% d'huile d'olive extra-vierge.

Les huiles ont été stockées à l'abri de la lumière. Les aliments ont été préparés hebdomadairement et stockés à + 4°C.

- 15 A J55, soit 3 semaines avant la fin de l'expérimentation, une inflammation a été provoquée dans chaque lot, excepté chez les témoins (SH). Quatre injections sous-cutanées de talc (3,2 g de silicate de magnésium (Sigma) mis en suspension dans 0,71 g/ml de sérum physiologique) ont été administrées en 4 points distincts du dos de l'animal.
- 20 Au sacrifice (J80), les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de chloral (Fluka / solution à 8% ; 0,4 ml/100g de poids vif). Des prélèvements sanguins ont été pratiqués au niveau de l'aorte abdominale pour le dosage de l'orosomucoïde (marqueur de l'inflammation, en particulier de la phase aiguë chez l'homme et le rat (Fournier et al. 2000), produit par le
- 25 foie et d'autres sites extra-hépatiques sous le contrôle des cytokines Il_1 , $TNF\alpha$ et Il_6).

La rate et l'utérus ont été pesés.

- Les fémurs ont été prélevés et débarrassés des tissus mous adjacents, puis conservés dans de l'éthanol à 80% pour la détermination de
- 30 la densité osseuse.

B. RESULTATS

EXEMPLE 1. Poids corporel et utérin (figures 1 et 2).

Le profil pondéral des animaux démontre une évolution similaire, à savoir une augmentation entre le début et la fin de la période expérimentale, quel que soit le groupe considéré. Néanmoins, dès la 2^{ème} semaine, le poids (g) des animaux castrés est supérieur à celui des SH (OVXinf : 294 ± 6 ; SH / 275 ± 6 . $p = 0,001$). Ce phénomène n'est pas corrigé par les deux régimes alimentaires.

Le poids utérin (g utérus/100g poids corporel) est diminué chez les OVXinf (modèle expérimental de l'ostéoporose) (SH / $0,221 \pm 0,017$; OVX/ $0,060 \pm 0,003$; $p < 0,001$). Il n'est pas restauré par les régimes oleuropéine ($0,034 \pm 0,001$) ou huile d'olive ($0,039 \pm 0,002$) qui sont donc dépourvus d'effet utérotrrophique.

EXEMPLE 2 : Densité minérale osseuse (figure 3).

La castration associée à l'inflammation s'est traduite par une déminéralisation du fémur, mise en évidence par une densité minérale osseuse totale (g/cm^2) réduite (SH : $0,2378 \pm 0,0050$; OVXinf : $0,2109 \pm 0,0018$ $p < 0,001$). Ce processus est évité (au moins partiellement) par la consommation d'huile d'olive ($0,2249 \pm 0,0038$) ou d'oleuropéine ($0,2258 \pm 0,0028$).

Un profil similaire est démontré au niveau trabéculaire, ainsi que dans l'os cortical (tissu ordinairement peu sensible aux facteurs environnementaux).

EXEMPLE 3 : Marqueurs de l'inflammation (figures 4 et 5).

La concentration en orosomucoïde ($\mu\text{g}/\text{ml}$) est supérieure chez les OVXinf : $35,9 \pm 7,5$; SH : $17,8 \pm 2,4$). Ce paramètre est restauré chez les rates ayant reçu le régime huile d'olive ($22,8 \pm 1,7$ $p < 0,005$). Une tendance similaire (mais non significative) est observée avec le régime oleuropéine.

Le poids de la rate (g rate/100g poids corporel) est augmenté chez les OVXINF (OVX inf : $0,254 \pm 0,009$; SH : $0,219 \pm 0,018$). Cette splénomégalie est évitée par la prise d'huile d'olive ($0,215 \pm 0,009$, $p < 0,01$) ou d'oleuropéine ($0,201 \pm 0,011$ $p < 0,02$).

REVENDICATIONS

1. Utilisation du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés pour la fabrication d'une composition destinée à stimuler la formation de l'os et/ou à
5 inhiber la résorption osseuse chez l'homme ou l'animal.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite composition est une composition nutritionnelle adaptée pour une
10 administration orale.
3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est destinée à stimuler la formation de l'os chez les individus jeunes en phase de croissance.
- 15 4. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir la perte osseuse qui se produit avec le vieillissement.
- 20 5. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir ou traiter des troubles liés à un déséquilibre du rapport entre la formation de l'os et la résorption osseuse.
- 25 6. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est destinée à traiter un déficit osseux résultant d'une fracture.
- 30 7. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est destinée à prévenir ou à traiter des pathologies choisies parmi, l'ostéoporose de type I ou de type II, les ostéoporoses secondaires, la maladie de Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse, les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie due à un cancer, les myélomes multiples, les maladies periodontales ou l'ostéoarthrite.

8. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce ladite composition nutritionnelle se présente sous forme de compositions alimentaires, de boissons, y compris des jus (de fruits ou de légumes), huiles, beurres, margarines, matières grasses végétales, conserves (par exemple thon à l'huile), soupes, préparations à base de lait (yaourts, fromage blanc), glaces, fromages (par exemple des fromages conservés dans de l'huile), produits cuits (tels que le pain, les biscuits et les gâteaux), desserts, produits de confiserie, barres de céréales, céréales pour le petit déjeuner, condiments, produits d'assaisonnement des aliments (notamment épices et sauces).
9. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle se présente sous la forme d'un produit destiné à l'alimentation animale, sous forme humide, semi-humide ou sèche.
10. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés se présente sous la forme d'un produit d'extraction obtenu à partir d'une plante appartenant à la famille des *Oleaceae*.
11. Utilisation selon la des revendication 10, caractérisée en ce que le produit d'extraction consiste en un produit extrait à partir des tiges, feuilles, des fruits ou des noyaux d'une plante appartenant à la famille des *Oleaceae*.
12. Utilisation selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce que la plante appartenant à la famille des *Oleaceae* est choisie parmi *olea europaea*, une plante du genre *Ligustrum*, une plante du genre *Syringa*, une plante du genre *Fraxinus*, une plante du genre *Jasminum* et une plante du genre *Osmanthus*.
13. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que le produit d'extraction consiste en de l'huile d'olive ou en un extrait riche en oleuropéine obtenu à partir de l'huile d'olive, ou des feuilles.

14. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 14, caractérisée en ce que ladite composition nutritionnelle est adaptée à une administration orale d'une quantité quotidienne comprise entre 0,01 à 200 mg du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés..
- 5 15. Composition nutritionnelle pour stimuler la formation de l'os et/ou inhiber la résorption osseuse, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de composé nutritionnel actif, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés.
- 10 16. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce ladite composition est une composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire.
- 15 17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est destinée à stimuler la formation de l'os chez l'individu jeune en phase de croissance.
- 20 18. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est destinée à prévenir la perte osseuse qui se produit au cours du vieillissement (ostéopénie).
- 25 19. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est destinée à prévenir ou traiter une pathologie liée à un déséquilibre du rapport entre la formation de l'os et la résorption osseuse.
- 30 20. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est destinée à traiter un déficit osseux résultant d'une fracture.
- 35 21. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir ou traiter une pathologie choisie parmi l'ostéoporose de type I ou de type II, les ostéoporoses secondaires, la maladie de Paget, la perte osseuse ou l'ostéolyse observée à proximité d'une prothèse, les maladies de l'os métastatique, l'hypercalcémie due à un cancer, les myélomes multiples, les maladies periodontales ou l'ostéoarthrite.

22. Utilisation selon l'une des revendications 16 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique se présente sous une forme pour l'administration orale, parentérale, intramusculaire ou intra-veineuse.
- 5
23. Utilisation selon l'une des revendications 16 à 21, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est adaptée à une administration orale d'une quantité quotidienne comprise entre 0,01 à 200 mg du composé oleuropéine ou de l'un de ses dérivés.
- 10
24. Composition pharmaceutique humaine ou vétérinaire pour stimuler la formation de l'os et/ou pour inhiber la résorption osseuse, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, le composé oleuropéine ou l'un de ses dérivés.
- 15

1/3

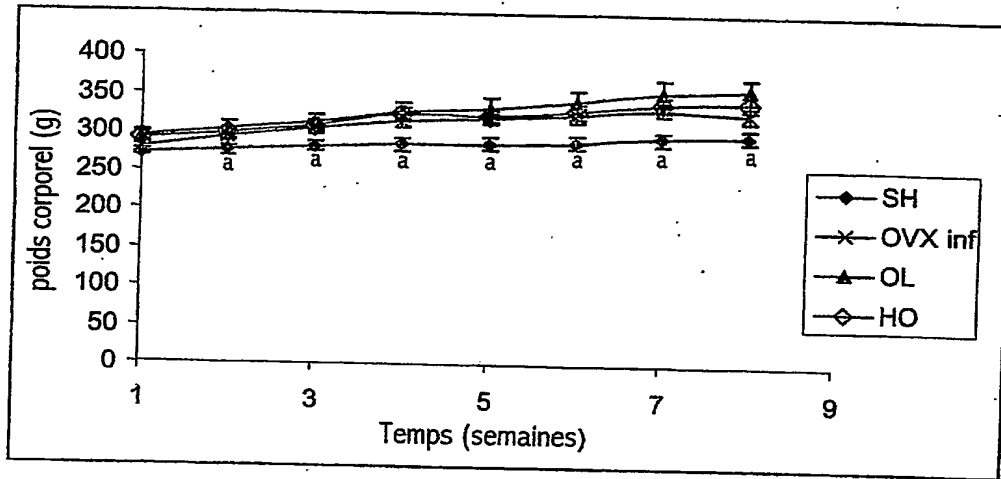


FIGURE 1

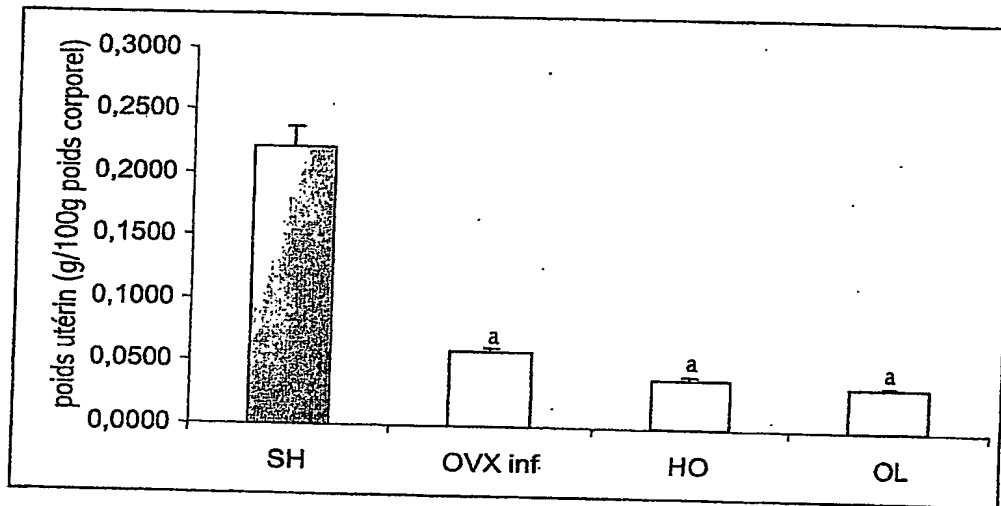


FIGURE 2

2/3

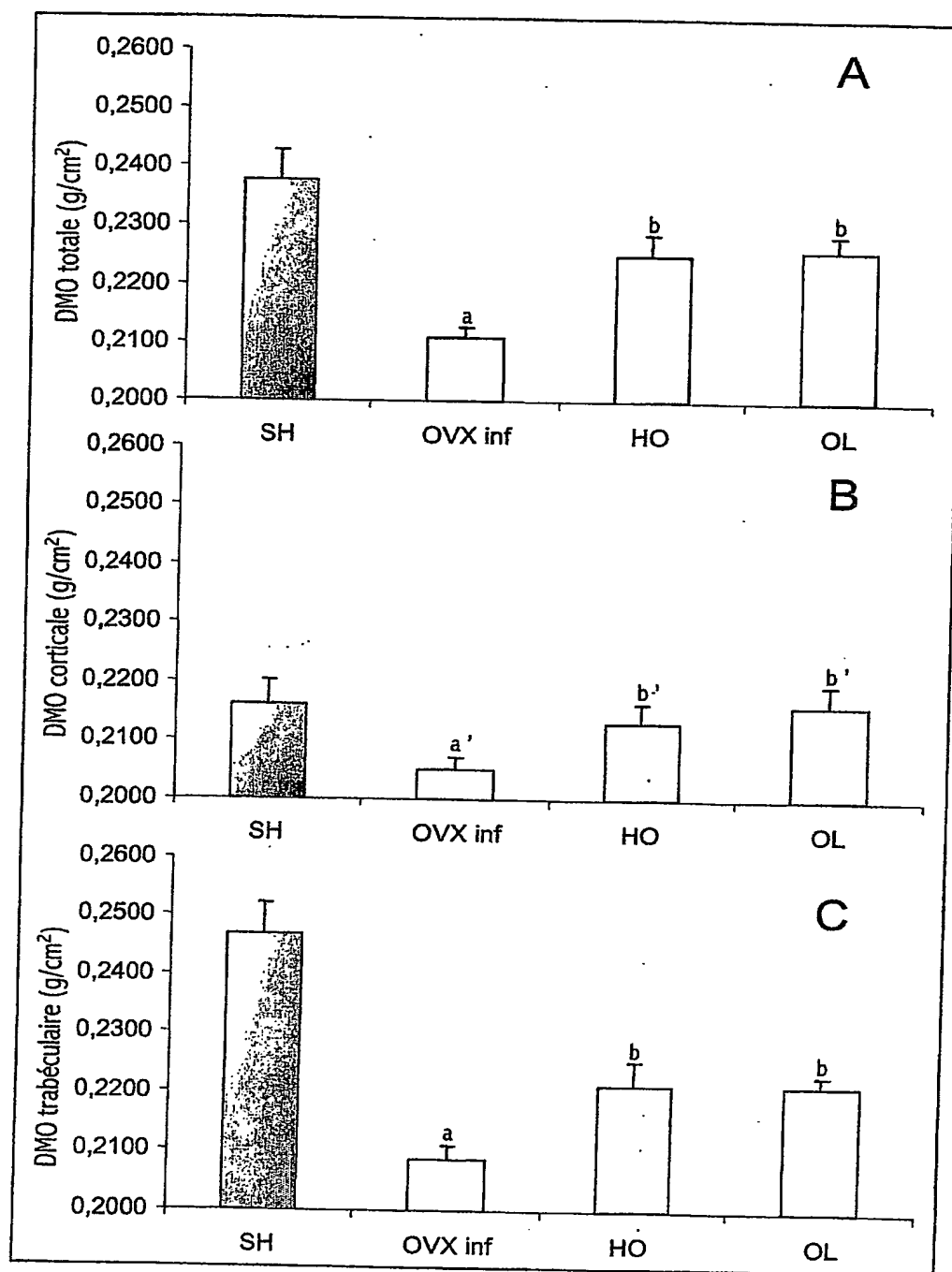


FIGURE 3

3/3

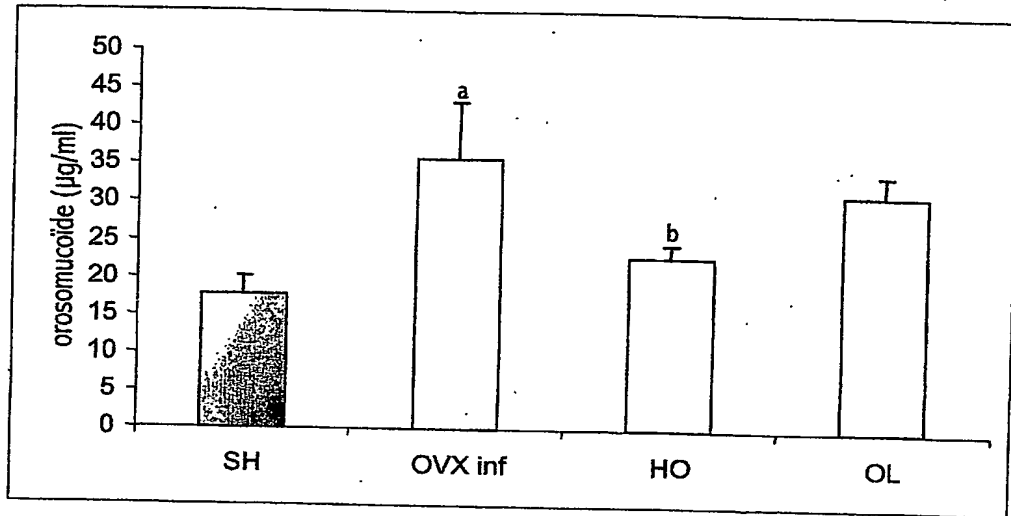


FIGURE 4

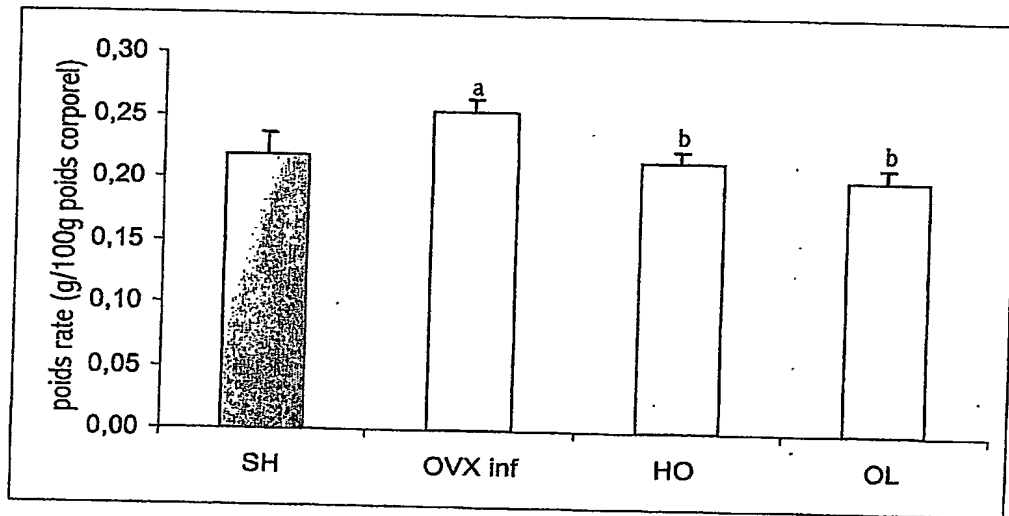


FIGURE 5



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	P954FR
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0304584
TITRE DE L'INVENTION	
	COMPOSITION NUTRITIONNELLE OU THERAPEUTIQUE CONTENANT LE COMPOSE OLEUROPEINE OU L'UN DE SES DERIVES.
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	ALAIN CATHERINE
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	COXAM
Prénoms	Véronique
Rue	45, Avenue de Beaulieu
Code postal et ville	63122 CEYRAT
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	SKALTSOUNIS
Prénoms	Leandros
Rue	Dionysou
Code postal et ville	15127 MELISSIA
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	PUEL
Prénoms	Caroline
Rue	38, rue Etienne Dolet
Code postal et ville	63000 CLERMONT FERRAND
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	MAZUR
Prénoms	André
Rue	10, rue des Pervenches
Code postal et ville	63800 Cournon d'Auvergne
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PARIS, LE 10 MAI 2004

CATHERINE Alain
C.P.I. bm (92-1045 i)
Cabinet HARLE ET PHELIP

PCT/FR2004/050156

